

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC

UNIDADE ACADÊMICA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

CURSO DE FARMÁCIA

DOUGLAS NUERNBERG DE MATOS

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR  $A_{2A}$  DE ADENOSINA NO  
PRÉ-CONDICIONAMENTO POR N-METIL-D-ASPARTATO (NMDA)  
EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À CONVULSÃO POR ÁCIDO  
QUINOLÍNICO**

CRICIÚMA, JUNHO DE 2011.

DOUGLAS NUERNBERG DE MATOS

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR A<sub>2A</sub> DE ADENOSINA NO PRÉ-  
CONDICIONAMENTO POR N-METIL-D-ASPARTATO (NMDA) EM  
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À CONVULSÃO POR ÁCIDO QUINOLÍNICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à banca examinadora para obtenção do Grau de Farmacêutico, no Curso de Farmácia da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, com linha de pesquisa em Mecanismos de Neuroproteção.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carina Rodrigues Boeck

CRICIÚMA, JUNHO DE 2011.

DOUGLAS NUERNBERG DE MATOS

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR A<sub>2A</sub> DE ADENOSINA NO PRÉ-  
CONDICIONAMENTO POR N-METIL-D-ASPARTATO (NMDA) EM  
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À CONVULSÃO POR ÁCIDO QUINOLÍNICO**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela banca examinadora para obtenção do Grau de Farmacêutico, no Curso de Farmácia da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, com linha de pesquisa em Mecanismos de Neuroproteção.

Criciúma, 20 de junho de 2011.

**BANCA EXAMINADORA**

Professora Doutora Carina Rodrigues Boeck - Universidade do Extremo Sul  
Catarinense, UNESC – Orientador

Professora Doutora Patrícia Fernanda Schuck – Universidade do Extremo Sul  
Catarinense, UNESC

Bacharel Leandra Celso Constantino – Universidade Federal do Estado de Santa  
Catarina, UFSC

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer e dedicar este trabalho primeiramente a Deus, pela força que me deu para a realização deste, que requereu muito estudo, paciência e esperança, requisitos básicos na pesquisa científica de laboratório.

Agradeço aos meus pais pela oportunidade de fazer a graduação, sempre me apoiando no que alcançaram e que confiaram em mim.

Agradeço aos colegas de aula que me aturaram até agora, deve ter sido difícil...

Agradeço também aos colegas atuais e passados do LABIM, Bruna Bardini (não vou colocar Brunão), Michelle Garcez, Gabriela Zambon, Daniela Bavaresco e à Daniela Leffa que me ajudaram inúmeras vezes nesse trabalho e nos outros que se passaram. Não posso esquecer-me da Leandra Constantino, que me colocou nesse mundo do *Western Blotting*, da ciência e me ensinou os primeiros passos.

E agradeço imensamente à minha orientadora, Carina Boeck, que com aquele jeito singular de lidar com as pessoas, sempre teve paciência, entendeu meus erros, deu uma brincadinha, fez cara de brava, mas me ensinou depois.

Foi um prazer compartilhar meu tempo, idéias e sentimentos com todos vocês.

Sinceramente, obrigado.

A vida sem ciência é uma espécie de morte.  
**Sócrates**

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR A<sub>2A</sub> DE ADENOSINA NO PRÉ-CONDICIONAMENTO  
POR N-METIL-D-ASPARTATO (NMDA) EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À  
CONVULSÃO POR ÁCIDO QUINOLÍNICO**

***PARTICIPATION OF A<sub>2A</sub> ADENOSINE RECEPTOR IN N-METHYL D-ASPARTATE (NMDA)  
PRECONDITIONING IN MICE SUBMITTED TO QUINOLINIC ACID SEIZURE***

MATOS, D. N.<sup>1</sup>, PESCADOR, B. B.<sup>1</sup>, ZAMBON, G. M.<sup>2</sup>, BAVARESCO, D. V.<sup>1</sup>, GARCEZ, M. L.;  
BOECK, C.R.<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Graduando do Curso de Farmácia, Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense-UNESC.

<sup>2</sup>Graduando do Curso de Medicina, Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense-UNESC.

<sup>3</sup>Professor Doutor do Curso de Farmácia, Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense-UNESC.

**Correspondência:**

Carina Rodrigues Boeck,

Av. Universitária, 1105;

Bairro Universitário, 88806-000, Criciúma, SC.

Tel.: +55 48 34312759, FAX: +55 48 34434817

e-mail: [bcr@unesc.net](mailto:bcr@unesc.net)

**Título resumido:** Envolvimento do A<sub>2A</sub> em convulsões por AQ.

**Fonte de Financiamento:** UNESC, FAPESC, CNPq.

## RESUMO

**Objetivo** – Avaliar ocorrência de convulsões e morte celular em camundongos pré-condicionados com NMDA e submetidos à convulsão por ácido quinolínico (AQ), com ou sem ZM241385, um antagonista do receptor  $A_{2A}$ . Imunodetectar receptores  $A_{2A}$  em córtex e hipocampo de camundongos pré-condicionados ou não, e submetidos à convulsão ocasionada por AQ.

**Metodologia** – Camundongos machos foram pré-condicionados com NMDA (75mg/kg;i.p) e o antagonista de  $A_{2A}$ , ZM241385 (1 $\mu$ L;100nM;i.c.v.) foi utilizado, quando previsto. Após 24h do NMDA, AQ (4 $\mu$ L/9,2mM) foi administrado i.c.v. Animais foram sacrificados 24h após administração de AQ. A ocorrência, latência e duração da convulsão foram aferidas. Morte celular foi avaliada por fluorescência de iodeto de propídio. Expressão de  $A_{2A}$  em córtex e hipocampo foi quantificada por *Western Blotting*.

**Resultados** – Pré-condicionamento protegeu 42,11% dos animais ( $P<0,05$ ). NMDA+ZM0h+AQ não altera a proteção ( $P<0,05$ ). A administração de NMDA+ZM1h+AQ diminui a proteção. Latência e duração da convulsão não foram alteradas em nenhum dos grupos. Na avaliação da morte celular, o grupo que recebeu somente AQ e o que recebeu ZM1h após NMDA apresentaram maior índice de morte celular, comparado ao salina. A expressão dos receptores não foi alterada em nenhum dos grupos estudados.

**Conclusões** – Pré-condicionamento com NMDA é capaz de proteger contra convulsões por AQ. A redução da proteção no grupo NMDA+ZM1h+AQ atribuí-se à modulação de  $A_{2A}$  sobre  $A_1$ . O bloqueio dos receptores  $A_{2A}$  posterior à ativação de  $A_1$  contribuiu para a morte celular induzida pelo AQ em camundongos pré-condicionados.  $A_{2A}$  provavelmente desencadeia mecanismos posteriores a si, mas sua expressão não é alterada.

Descritores: RECEPTORES  $A_{2A}$ ; NEUROPROTEÇÃO; CONVULSÃO; ÁCIDO QUINOLÍNICO; NMDA

## ABSTRACT

**Objective** – To evaluate seizure occurrence and cell death in mice pre-conditioned with NMDA and submitted to quinolinic acid (QA)-induced seizure, with or without ZM241385, an A<sub>2A</sub> receptor antagonist. To immunodetect A<sub>2A</sub> receptor in cortex and hippocampus of pre-conditioned mice, submitted or not to QA-induced seizure.

**Methods** – Male mice were pre-conditioned with NMDA (75mg/kg;i.p.) and the A<sub>2A</sub> receptor antagonist, ZM241385 (1μL;100nM;i.c.v.), was used when needed. 24h after NMDA administration, QA (4μL;9,2mM;i.c.v) was administered. Animals were killed 24h after QA administration. The seizure occurrence, latency and duration were measured. Cell death was evaluated by propidium iodide fluorescence. A<sub>2A</sub> expression in cortex and hippocampus was measured by using Western Blotting.

**Results** – Pre-conditioning protected 42,11% of the animals (P <0,05). NMDA+ZM0h+AQ did not interfere in the protection (P<0,05). Administration of NMDA+ZM1h+AQ showed diminution in the protection. Latency and duration of seizure was not affected in any of the groups. In cell death, QA group and the NMDA+ZM1h+AQ group showed more cell death index, compared to saline. The receptors expression was not altered in any of the groups.

**Conclusions** – NMDA pre-conditioning protect against QA-induced seizure. The diminution on protection of NMDA+ZM1h+AQ group can be attributed to a modulation that A<sub>2A</sub> exerts over A<sub>1</sub>. Blockade of A<sub>2A</sub> receptors, after the activation of A<sub>1</sub> receptor, contributed to QA-induced cell death in pre-conditioned mice. A<sub>2A</sub> probably starts mechanisms posteriors to itself, but your expression is not altered.

**Keywords:** A<sub>2A</sub> receptors; neuroprotection; seizure; quinolinic acid; NMDA.



## INTRODUÇÃO

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos (1). Sua função é exercida através de seus receptores ionotrópicos (iGLUR) e metabotrópicos (mGLUR). Os receptores do glutamato são encontrados principalmente no SNC, mas sua ação já foi descrita em outros tipos celulares não-neurais (2; 3). Dentre esses são descritos os subtipos: receptores ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA), cainato (KA) e N-metil-D-aspartato (NMDA) (4).

Os receptores NMDA, dentre os receptores ionotrópicos, têm características únicas, como o requisito de ligação simultânea de glutamato e glicina para a sua ativação. Ácido quinolínico (AQ) e NMDA também o agonizam. Com o potencial de membrana plasmática do neurônio em repouso, o receptor NMDA possui o canal bloqueado pelo íon magnésio ( $Mg^{2+}$ ) (2).

A liberação do glutamato permite o influxo de  $Na^+$  através da ligação nos receptores AMPA do neurônio pós-sináptico, resultando em uma despolarização parcial, suficiente para remover o bloqueio pelo  $Mg^{2+}$ . O receptor NMDA é permeável a  $Na^+$ , mas principalmente a  $Ca^{2+}$ . O  $Ca^{2+}$  é mediador da maioria dos efeitos fisiológicos da atividade dos receptores NMDA (5). Fisiologicamente, a ativação do NMDA está envolvida em processos importantes como a aprendizagem, memória, transmissão e plasticidade sináptica, proliferação e migração celular (5; 6; 7). Porém, a sua excessiva estimulação tem sido relacionada com a epilepsia e com danos cerebrais associados à isquemia/hipoglicemia devido ao grande aumento dos níveis iônicos no meio intracelular, principalmente do íon  $Ca^{2+}$  (8; 9), caracterizando o quadro de excitotoxicidade.

A neurotoxicidade por NMDA pode ser bloqueada em presença de antagonistas do receptor, por altas concentrações dos íons  $Mg^{2+}$  ou por remoção do  $Ca^{2+}$  extracelular pela presença de agentes quelantes (10). Uma estratégia de neuroproteção decorre do uso de doses sub-tóxicas/sub-convulsivantes do glutamato ou do NMDA – pré-condicionamento químico – como prevenção contra um subsequente estímulo tóxico, em que o glutamato estará em altas doses (11;12; 13; 14).

O pré-condicionamento por NMDA tem demonstrado proteção neuronal *in vitro* (14) e *in vivo* (15; 16) contra danos subsequentes. *In vitro*, NMDA preveniu morte celular induzida por

glutamato, NMDA (14; 16; 17) e privação de glicose-oxigênio (18; 19). *In vivo*, o pré-condicionamento químico protege contra toxicidade induzida por cainato (20) ou isquemia (21). O pré-condicionamento por NMDA protege contra convulsões e morte neuronal induzida por AQ em camundongos (15).

A interação entre o sistema adenosinérgico e o glutamatérgico é um tema intensamente estudado, e atualmente busca-se relacionar estes sistemas ao mecanismo de tolerância induzido pelo pré-condicionamento químico (12; 14; 15). As ações fisiológicas da adenosina são mediadas por receptores específicos acoplados a proteínas-G, que são divididos em A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> (22), em que A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub> inibem a adenilato ciclase e A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> a estimulam (23, 24, 25). Adenosina é considerada um neuromodulador no SNC e tem sido considerado um anticonvulsivante endógeno (26; 27) com grande capacidade anticonvulsiva em vários modelos de convulsão.-

Os efeitos inibitórios dos receptores A<sub>1</sub> de adenosina são considerados os principais responsáveis pela proteção neuronal, através da diminuição da liberação de neurotransmissores na fenda sináptica, entre eles o glutamato (28), provavelmente relacionado com a diminuição do influxo de Ca<sup>+2</sup> na pré-sinapse (29).

Os receptores A<sub>2A</sub> de adenosina, por sua vez, estão sendo pesquisados a fim do melhor entendimento das estratégias de neuroproteção, principalmente nas doenças em que a excitotoxicidade possui um efeito crítico na patogenia (30). O uso de antagonistas destes receptores, por exemplo ZM241385 (ou ZM) [(4-(2[7-Amino-2-(2-furyl{1,2,4}-triazolo{2,3-a{1,3,5}triazian-5-yl-aminoethyl}phenol)] bloqueia a liberação de glutamato induzida por isquemia (31; 32) e AQ (33; 34), um efeito causado, provavelmente, devido ao bloqueio na pré-sinapse dos terminais glutamatérgicos (35). Os também antagonistas, CSC [8-(3-chlorostyryl) caffeine], CGS 15943 [9-chloro-2-(2-furanyl)-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazolin-5-amine] e CP 66713 [4-amino[1,2,4]triazolo [4,3a]quinoxalines], protegem dano celular do hipocampo durante isquemia global no prosencéfalo em roedor (36).

Considerando que o NMDA é capaz de proteger o cérebro de camundongos e evitar convulsões quando administrado intraperitonealmente (i. p.), 24 horas antes de convulsões induzidas por AQ, e que os mecanismos do sistema adenosinérgico estão envolvidos na neuromodulação que leva a morte ou sobrevida neuronal, este trabalho teve por objetivo avaliar a participação dos

receptores  $A_{2A}$  de adenosina na neuroproteção induzida pelo pré-condicionamento NMDA, bem como a viabilidade celular do tecido do hipocampo.

## **MÉTODOS**

### **Animais e aspectos éticos**

Os camundongos albinos CF1 machos adultos (60 dias; 30-40g), foram mantidos em temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  em um ciclo de 12 horas claro (a partir das 7 horas) e 12 horas escuro, em gaiolas plásticas (5 animais por caixa) com água e ração à vontade. Os nossos protocolos para experimentos com animais são projetados de maneira que o animal tenha o mínimo de sofrimento possível e com limite de animais mortos, seguindo as recomendações da Comissão de Ética no Uso de Animais da UNESCO, conforme protocolo aprovado n° 60/2009.

### **Procedimento cirúrgico**

Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (i.p, 1mg/mL) e uma cânula foi implantada no ventrículo cerebral lateral direito, para infusão intracérebroventricular (i.c.v) de AQ. Em um aparato estereotáxico, a pele do crânio foi removida e uma cânula guia de 27 G/7 mm foi implantada a 1 mm posterior ao bregma, 1 mm a direita da linha mediana, 1 mm abaixo do ventrículo lateral e fixada com cimento acrílico. Os animais foram utilizados 48 horas após a cirurgia, para que estivessem completamente recuperados desta (15).

### **Tratamento com NMDA**

Os animais receberam salina (NaCl 0,9%) ou doses sub-convulsivas (75 mg/Kg) de NMDA (Sigma-Aldrich) 48 horas após a cirurgia i.p. Após a administração i.p. de NMDA, os animais foram colocados individualmente em caixas de acrílico (25 x 25 x 25 cm) e foram observados por 30 minutos para ocorrência de mudanças comportamentais. Os animais receberam o antagonista do receptor  $A_{2A}$  de adenosina, ZM241385 (Tocris Bioscience) (1µL, 100 nM), i. c. v. imediatamente ou 1 hora após o

NMDA. Após os tratamentos, os animais retornaram para suas respectivas caixas-moradia e permaneceram por 24 horas até a administração do AQ (15).

### **Convulsões induzidas por Ácido Quinolínico**

Os camundongos receberam salina (NaCl 0,9%) ou o AQ (Sigma-Aldrich) (4  $\mu$ L; 9,2 mM) i.c.v. através de uma agulha de 30 G/8 mm, introduzida pela cânula guia, 24 horas após o tratamento com NMDA. Os animais foram colocados em caixas de acrílico (25 x 25 x 25 cm) e observados por 10 minutos para a ocorrência de mudanças comportamentais como 'wild running' (corrida involuntária), episódios tônicos ou clônicos e/ou tônico-clônico, que deve ocorrer por pelo menos 5 segundos (37) para confirmação da convulsão. Os animais pré-tratados com NMDA que não apresentaram as convulsões após a administração do AQ foram considerados protegidos. Os animais retornaram para as suas respectivas gaiolas e permaneceram por 24 horas até sua morte (15).

### **Permeabilidade de Membrana**

Azul de metileno (4  $\mu$ L) foi injetado através da cânula-guia 24h após a infusão de AQ e os animais que não apresentaram coloração azul característica no ventrículo lateral foram descartados. Os camundongos foram mortos por deslocamento cervical e decapitados rapidamente. O cérebro foi removido integralmente, e o hipocampo dissecado imediatamente em tampão fosfato-salina (PBS), adicionado de 10mM de glicose. O hipocampo foi então cortado em fatias transversais de 400 $\mu$ m de espessura com *McIlwain tissue chopper*, e as fatias foram colocadas em PBS+0,6% de glicose (pH 7,4) e separadas em fatias individuais. Em média, quatro fatias da parte mediana do hipocampo foram selecionadas e colocadas numa placa de 96-well contendo o tampão PBS citado acima. A morte celular foi verificada utilizando o método de exclusão, em que o iodeto de propídio (IP), que é um composto polar que tem a capacidade de entrar somente em células mortas ou em processo de morte, através dos danos presentes na membrana destas. Uma vez dentro das células, IP forma um complexo com DNA, produzindo fluorescência de cor vermelha muito intensa (630 nm) quando excitada por luz verde (495

nm). As fatias foram então incubadas com 7,5 µg/mL de IP por 1h e então analisadas por microscópio invertido (Nikon Eclipse E200) utilizando filtro rodamina. A fluorescência oriunda da captação de IP pelas células foi quantificada por análise densitométrica com Scion Image software (Scion Corporation).

### **Separação de Proteínas por Eletroforese (SDS-PAGE)**

Os grupos dos animais foram divididos de acordo com os tratamentos destinados ao *Western Blotting* em: SAL (salina i.p. + salina i.c.v.), NMDA (NMDA i.p. + salina i.c.v.), AQ (salina i.p. + ácido quinolínico i.c.v.), NMDA + AQ (nc) (animais protegidos pelo pré-condicionamento com NMDA - não convulsionaram após a administração do ácido quinolínico); NMDA + AQ (c) (animais não protegidos pelo pré-condicionamento com NMDA - convulsionaram após a administração do ácido quinolínico). 24 horas após a administração do AQ, o azul de metileno (4 µL) foi injetado através da cânula guia para corar o ventrículo lateral cerebral dos camundongos. Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e decapitados rapidamente. O cérebro foi removido integralmente e foi realizada a seleção histológica das áreas estudadas. Somente os animais que apresentaram o ventrículo corado foram utilizados. As áreas cerebrais hipocampo e córtex foram dissecadas. As amostras foram solubilizadas em tampão de amostra composto por duodecil sulfato de sódio (SDS) 4%, Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM e β-mercaptoetanol 8%, pH 6,8; e diluídas em solução de diluição: 40% de glicerol, 25 mM de Tris-HCl e azul de bromofenol pH 6,8. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE (70 µg/poço) usando gel de separação com gradiente de acrilamida. A concentração da acrilamida no gel de entrada foi de 4% e no gel de separação foi de 12%. A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 40 mA e voltagem máxima de 140 mV (para 2 géis), por aproximadamente 2 horas. Após a corrida, os géis foram submetidos à eletrotransferência em tampão Tris-HCl 50 mM, glicina 140 mM e metanol 10% por 1 hora, em corrente de no máximo 100 mA e voltagem de 350 mV a 4 °C, para transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose de 0,45 µm de porosidade.

### ***Western blotting***

Após a eletrotransferência, as membranas foram bloqueadas por 15 minutos com leite desnatado 10% em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) e a seguir lavadas com TBS-T (Tween-20 0,05%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). As membranas foram incubadas por 1 hora, sob agitação, com anticorpo primário Rabbit Anti A<sub>2A</sub> (1:500 – Santa Cruz). Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T e o respectivo anticorpo secundário (ligado à peroxidase) foi incubado por 10 minutos na concentração de 1:1500. Após lavagens com TBS-T e TBS a imunodeteção foi revelada por emissão de quimioluminescência com reagentes luminescentes, seguindo as recomendações do fabricante, e impressão de imagem em filme auto-radiográfico. As imagens foram digitalizadas para quantificação densitométrica das bandas protéicas dos complexos imunes (software Scion Image, Scion Corporation).

### ***Análise estatística***

Os resultados foram analisados através do programa STATISTICA versão 7.0 (StatSoft, Inc., USA). Todos os dados estão expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão. O parâmetro de normalidade foi estabelecido pelo teste de Shapiro-Wilk. A análise da ocorrência de convulsão entre os respectivos grupos foi realizada pelo Teste Exato de Fisher. A latência para a ocorrência e a duração da convulsão foi analisada pelo Teste U de Mann-Whitney. A expressão dos receptores A<sub>2A</sub> de adenosina foi analisada com por ANOVA de uma via. A morte celular foi analisada com ANOVA uma via. Diferenças foram consideradas significativas com  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

### **Efeito do pré-condicionamento com NMDA e uso de ZM241385 na ocorrência de convulsões induzidas por AQ**

Após a administração dos tratamentos, observaram-se mudanças comportamentais como episódios tônicos ou clônicos e/ou tônico-clônicos, e *wild running* (corrida involuntária), que foram caracterizados como ocorrência de convulsão (Tabela 1). Cronometrou-se a duração das convulsões e a latência destas (Tabela 2). Todos os animais que receberam AQ convulsionaram. O tratamento somente com NMDA não induziu convulsão. Os animais pré-condicionados com NMDA apresentaram uma menor incidência de convulsões após a administração de AQ. A administração do antagonista imediatamente após o NMDA (ZM 0h) não modificou a proteção induzida pelo pré-condicionamento, contudo ZM administrado 1h após o NMDA reduziu a proteção conferida pelo pré-condicionamento com o NMDA.

Os animais pré-condicionados não mostraram diferença significativa no tempo de latência e duração da convulsão quando comparado ao grupo que recebeu somente AQ. O antagonista de A<sub>2A</sub> não mostrou diferença significativa em nenhum dos grupos analisados (Tabela 2).

### **Efeito do pré-condicionamento com NMDA e uso de ZM241385 na morte celular induzida por AQ**

A fim de verificar a morte celular induzida pelos tratamentos utilizados, foi realizado o ensaio de captação de IP, que ocorre somente em células mortas ou em processo de morte em que há dano à parede celular. A morte celular presente no grupo salina pode ser atribuída ao fatiamento do tecido. Percebeu-se que, quando comparado ao grupo salina, o grupo que recebeu somente AQ teve maior índice de morte celular. O mesmo aconteceu com o grupo que recebeu ZM241385 1 hora após a administração de NMDA. Os outros grupos não apresentaram diferenças significativas quando comparados ao grupo salina.



**Efeito do pré-condicionamento com NMDA contra convulsão por AQ na expressão dos receptores A<sub>2A</sub> de adenosina**

A expressão dos receptores A<sub>2A</sub> de adenosina em córtex cerebral e hipocampo foi avaliada por *Western Blotting* (Figuras 2 e 3). Não houve diferenças significativas entre os grupos analisados, tanto em hipocampo quanto em córtex cerebral.

## DISCUSSÃO

Os mecanismos que envolvem a gênese da epilepsia ainda não estão completamente elucidados. Sabe-se que, nos pacientes que sofrem de crises epiléticas, o metabólito endógeno do triptofano, AQ, está em quantidades acima das basais (38). O AQ, junto com glutamato e NMDA, é um agonista dos receptores glutamatérgicos. Dentre os receptores ao qual se ligam está o NMDA, capaz de deixar permear à célula pós-sináptica íons positivos como  $\text{Na}^+$  e o  $\text{Ca}^{+2}$  (5). Sendo assim, pode-se explicar a superestimulação dos neurônios quando há excesso de AQ.

A infusão intracérebroventricular de AQ exógeno tem sido utilizado como modelo de convulsão (37), considerando a sua farmacologia exposta acima. Nossos resultados corroboram estudos já realizados e mostram que todos os animais que receberam somente a infusão de AQ convulsionaram (Tabela 1), ao passo que os animais que receberam doses sub-convulsivas de NMDA 24h antes do AQ foram protegidos em 42,11% dos casos, proteção esta que já foi verificada por Boeck, 2004(15).

Altos níveis de adenosina são observados no espaço extracelular em situações de lesão ao tecido cerebral, assim como quando os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA são ativados (39; 40).

A ocorrência de convulsão nos grupos foi observada após a administração do AQ. O grupo que recebeu o antagonista de  $\text{A}_{2\text{A}}$  imediatamente após a administração i.p. de NMDA (NMDA+ZM0h+AQ) não mostrou diferença significativa na proteção induzida através dos receptores NMDA quando comparado ao grupo AQ (Tabela 1), sugerindo que houve inibição dos receptores  $\text{A}_{2\text{A}}$  de adenosina e esta inibição imediatamente após a injeção de NMDA não modifica a proteção contra convulsão mediada por estes receptores. Porém, naqueles animais que receberam o antagonista 1h após a administração do NMDA (NMDA+ZM1h+AQ), a proteção induzida foi reduzida quando comparada ao grupo AQ (Tabela 1).

Os tempos de latência e duração da convulsão não foram alterados entre os grupos, indicando que tanto o NMDA quanto o uso de ZM241385 não alteram o tempo para ocorrência da convulsão bem como a duração desta (Tabela 2).

Estudos sugerem que a adenosina intracelular quando liberada para o meio extracelular, age preferencialmente nos receptores  $A_1$ , enquanto que a adenosina extracelular, formada pela via das ectonucleotidases, favorece a ativação dos receptores  $A_{2A}$  (41).

O receptor  $A_1$  de adenosina tem sido colocado com grande importância na neuromodulação (26) e parece estar relacionado à proteção induzida por isquemia e NMDA (14). Sabe-se que o meio intracelular possui maior concentração de adenosina do que o meio extracelular (0,5 a 4 $\mu$ M *versus* 10 a 50nM, respectivamente) (28) e a adenosina intracelular pode ser transportada para o meio extracelular pelos seus transportadores equilibrativos (TEN) (41). O CPT (antagonista  $A_1$ ) quando administrado imediatamente antes do NMDA preveniu a neuroproteção exercida pelo NMDA, como demonstrado por Boeck, (2004) (15), elucidando seu envolvimento no mecanismo de neuroproteção exercido pelo NMDA. O receptor  $A_{2A}$  de adenosina é capaz de realizar *cross-talk* com o  $A_1$  (42), de modo a fazer a *downregulation* deste, quando ativado (43).

Com isso podemos dizer que a existe antagonização de  $A_{2A}$  imediatamente após a administração de NMDA e esta não influencia na neuroproteção induzida por este, visto que há grande ligação da adenosina recém saída do meio intracelular pelos TEN, nos receptores  $A_1$ , permitindo ao  $A_1$  executar seu papel. Contudo, após 1 hora, sugere-se que a cascata das ectonucleotidases já está ativa e produzindo adenosina, que se ligará preferencialmente ao  $A_{2A}$ , levando a *downregulation* de  $A_1$ , sugerindo que não houve antagonização total de  $A_{2A}$ , justificando a diminuição da neuroproteção induzida por NMDA no grupo NMDA+ZM1h+AQ.

A morte celular no hipocampo foi quantificada utilizando-se a fluorescência emitida pela conjugação do IP ao DNA das células com membrana permeável. Quanto maior a quantidade de fluorescência emitida pela célula e quantificada pelo Scion Image (ScionCorp), maior foi a morte celular.

A figura 1A mostra as imagens representativas de cada grupo. O grupo salina apresentou índice de morte celular que pode ser atribuído ao fatiamento do tecido (15). A morte celular induzida pela administração de somente AQ foi maior que o grupo controle (Figura 1B), provavelmente devido à excitotoxicidade mediada por receptores NMDA, que permitiram o influxo excessivo de  $\text{Ca}^{+2}$ , degradando os lipídios de membrana (44), permitindo assim a entrada do IP e sinalizando a morte celular. A administração de ZM 1h após a administração de NMDA contribuiu para a morte celular induzida pelo AQ em camundongos pré-condicionados, sugerindo que ocorreram fenômenos muito semelhantes aos apresentados na discussão sobre a ocorrência de convulsões. Porém, sugere-se a determinação da atividade das ectonucleotidases para confirmar a participação destas no pré-condicionamento, levando em consideração do tempo de 1h para sua ativação e hidrólise de ATP/ADP/AMP, bem como sugere-se a verificação da capacidade de ligação de ZM em  $\text{A}_{2\text{A}}$  1h após o NMDA para determinação do antagonismo destes receptores frente à ligação de adenosina promovida pela ativação dos receptores NMDA. Os resultados obtidos não mostraram diferenças estatísticas significativas entre os grupos estudados, tanto em córtex cerebral quanto em hipocampo (Figuras 2 e 3).

Visto que houve diferença na neuroproteção entre os tempos de antagonismo do receptor  $\text{A}_{2\text{A}}$ , e a quantidade expressa do receptor não foi alterada, sugere-se que a atividade mediada pelo  $\text{A}_{2\text{A}}$  não é alterada pela sua expressão, mas sim por mecanismos modulados por ele. O envolvimento dos receptores de adenosina em mecanismos de pré-condicionamento é um tema que já vem sendo estudado há algum tempo, contudo os mecanismos relacionados a ela ainda não estão bem definidos, sendo que se faz necessária maior investigação nos aspectos relacionados às ectonucleotidases, à capacidade de antagonismo do ZM, e ainda sobre a modulação de  $\text{A}_{2\text{A}}$  sobre  $\text{A}_1$ . Sugere-se avaliar também as implicações na morte celular e proteção contra as convulsões e ainda a função específica de  $\text{A}_{2\text{A}}$  na neuroproteção por NMDA.

## REFERÊNCIAS

- 1     Hardingham GE. Pro-survival signalling from the NMDA receptor. *Biochem Soc Trans* 2006; 34:936-38.
- 2     Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 1999 Mar; 51(1):7-61.
- 3     Hinoi E, Takarada T, Ueshima T, Tsuchihashi Y, Yoneda Y. Glutamate signaling in the peripheral tissues. *Eur J Biochem* 2004; 271: 1-13.
- 4     Caversan OM. Regulação da expressão de subunidades do receptor NMDA em culturas de retina. 2008. 119 f. Dissertação (mestrado em neuroimunologia) - Laboratório de Neurobiologia Celular do Departamento de Neurobiologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense: Niterói; 2008.
- 5     Hardingham GE. Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. . *Biochem Soc Trans* 2009 December; 37: 1147–1160.
- 6     Thomas KL, Davis S, Hunt SP, Laroche S. Alteration in the expression of specific glutamate receptor subunits following hippocampal LTP in vivo. *Learn Mem* 1996; 3( 2-3):197-208.
- 7     Izquierdo, I. Memória. Porto Alegre: Artmed; 2002.
- 8     Olney JW. Excitatory transmitter neurotoxicity. *Neurobiol Aging* 1994;15( 2):259-260.
- 9     Rejdak R, Rejdak K, Sieklucka-Dziuba M. Effect of MK-801 on pilocarpine-evoked seizures in mice exposed to transient incomplete brain ischemia. *Pol J Pharmacol* 2000; 52( 4):275-281.
- 10    Choi DW. Possible mechanisms limiting N-methyl-D-aspartate receptor overactivation and the therapeutic efficacy of N-methyl-D-aspartate antagonists. *Stroke* 1990 Nov;21(11 Suppl):III20-2.
- 11    Chuang DM, Gao XM, Paul SM. N-methyl-D-aspartate exposure blocks glutamate toxicity in cultured cerebellar granule cells. *Mol Pharmacol* 1992;42(2):210-6.
- 12    Tauskela JS, Comas T, Hewitt K. et al. Cross-tolerance to otherwise N-methyl-D-aspartate and oxygen-glucose deprivation in preconditioned cortical neurons. *Neuroscience* 2001;107(4):571-84.
- 13    Jiang X, Tian F, Mearow K, Okagaki P, Lipsky RH, Marini AM. The excitoprotective effect of N-methyl-D-aspartate receptors is mediated by a brain-derived neurotrophic factor autocrine loop in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem*. 2005;94(3):713-22.
- 14    Boeck CR, Kroth EH, Bronzatto MJ, Vendite, D. Adenosine receptors co-operate with NMDA preconditioning to protect cerebellar granule cells against glutamate neurotoxicity. *Neuropharmacology* 2005;49(1):17-24.
- 15    Boeck CR, Ganzella M, Lottermann AL, Vendite D. NMDA preconditioning protects against seizures and hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid in mice. *Epilepsia* 2004;45(7):745-50.
- 16    Vandresen-Filho S, Herculano BA, Franco JL, Boeck CR, Dafré AL, Tasca CI. Evaluation of glutathione metabolism in NMDA preconditioning against quinolinic acid-induced seizures in mice cerebral cortex and hippocampus. *Brain Res* 2007 12;1184:38-45

- 17 Dickie BGM, Holmes C, Greenfield SA. Neurotoxic and neurotrophic effects of chronic N-methyl-d-aspartate exposure upon mesencephalic dopaminergic neurons in organotypic culture. *Neuroscience* 1996;72:731–41
- 18 Pringle AK, Thomas SJ, Signorelli F, Iannotti F. Ischaemic pre-conditioning in organotypic hippocampal slice cultures is inversely correlated to the induction of the 72 kDa heat shock protein (HSP72). *Brain Res* 1999;845:152–64.
- 19 Valentim LM, Rodnight R, Geyer AB, Horn AP, Tavares A, Cimarosti H, et al. Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immuncontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *Neuroscience* 2003;118:379–86
- 20 Ogita K, Okuda H, Yamamoto Y, Nishiyama N, Yoneda Y. In vivo neuroprotective role of NMDA receptors against kainate-induced excitotoxicity in murine hippocampal pyramidal neurons. *J Neurochem* 2003;85:1336–46
- 21 Miao B, Yin XH, Pei DS, Zhang QG, Zhang GY. Neuroprotective effects of preconditioning ischemia on ischemic brain injury through down-regulating activation of JNK1/2 via N-methyl-d-aspartate receptor-mediated Akt1 activation. *J Biol Chem* 2005;280(23):21693–9
- 22 Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 2001; 53(4):527-52.
- 23 Palmer TM, Stiles GL. Adenosine receptors. *Neuropharmacology*. 1995; 34: 683-94
- 24 Haas HL, Selbach O. Functions of neuronal adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000;362:375–81.
- 25 Jarvis M, Williams M. Adenosine in the central nervous system. In: Williams M, editor. *Adenosine and Adenosine Receptors*. Totowa: Humana Press; 1990. p. 423–60.
- 26 Dragunow M. Adenosine: the brain's natural anticonvulsant. *Trends Pharmacol Sci* 1986;7:128–30.
- 27 Dragunow M. Purinergic mechanisms in epilepsy. *Prog Neurobiol* 1988;31:85–108.
- 28 Cunha RA. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int* 2001; 38(2):107-25.
- 29 Vacas J, Fernández M, Ros M, Blanco P. Adenosine modulation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in cerebellar granule cells: multiple adenosine receptors involved. *Brain Res* 2003 5;992(2):272-80.
- 30 Pepponi R, Ferrante A, Ferretti R, Martire A, Popoli P. Region-specific neuroprotective effect of ZM 241385 towards glutamate uptake inhibition in cultured neurons. *Eur J Pharmacol* 2009 1;617(1-3):28-32
- 31 Melani A, Pantoni L, Bordoni F, et al. The selective adenosine A2A receptor antagonist SCH 58261 reduces striatal transmitter outflow, turning behaviour and ischemic brain damage induced by permanent focal ischemia in the rat. *Brain Res* 2003 10;959(2):243-50.
- 32 Marcoli M, Raiteri L, Bonfanti A, et al. Sensitivity to selective adenosine A1 and A2A receptor antagonists of the release of glutamate induced by ischemia in rat cerebrocortical slices. *Neuropharmacology* 2003;45(2):201-10.

- 33 Popoli P, Pintor A, Domenici MR et al. Blockade of striatal adenosine A2A receptor reduces, through a presynaptic mechanism, quinolinic acid-induced excitotoxicity: possible relevance to neuroprotective interventions in neurodegenerative disease of striatum. *J Neurosci* 2002 1;22(5):1967-75.
- 34 Popoli P, Frank C, Tebano MT, Potenza RL, Pintor A, Domenici M, Nazzicone V, Pèzzola A, Reggio R. Modulation of glutamate release and excitotoxicity by adenosine A2A receptors. *Neurology* 2003 9;61(11 Suppl 6):S69-71.
- 35 Hettinger BD, Lee A, Linden J, Rosin DL. Ultrastructural localization of adenosine A2A receptors suggests multiple cellular sites for modulation of GABAergic neurones in rat striatum. *J Comp Neurol* 2001 12;431(3):331-46.
- 36 Phillis JW. The effects of selective A1 and A2a adenosine receptor antagonists on cerebral ischemic injury in the gerbil. *Brain Res* 1995 24;705(1-2):79-84.
- 37 Hallak M, Irtenkauf SM, Janusz CA, Cotton DB. Stimulation and inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in rats: developing a seizure model. *Am J Obstet Gynecol*, v.169, n.3, p. 695-700, 1993.
- 38 Heyes MP, Saito K, Crowley JS. Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurological disease. *Brain* 1992; 115:1249-73
- 39 Hoehn K, White TD. Role of excitatory amino acid receptors in KC- and glutamate evoked release of endogenous adenosine from rat cortical slices. *J Neurochem* 1990; 54: 256 e 265.
- 40 Craig CG, White TD. N-Methyl-D-aspartate and non-Nmethyl-D-aspartate-evoked adenosine release from rat cortical slices: distinct purinergic sources and mechanisms of release. *J Neurochem* 1993; 60:1073-1080.
- 41 Cunha RA, Correia-De-Sá P, Sebastião AM, Ribeiro JA. Preferential activation of excitatory adenosine receptors at hippocampal and neuromuscular synapses by adenosine formed from released adenine nucleotides. *Br J Pharmacol* 1996, 119: 253-260,.
- 42 Lopes LV, Cunha RA, Ribeiro JA. Cross talk between A1 And A2A adenosine receptors in the hippocampus and cortex of young adult and old rats. *J Neurophysiol*. 1999 Dec;82(6):3196-203.
- 43 Lopes LV, Cunha RA, Kull B, Fredholm BB, Ribeiro JA. Adenosine A2A receptor facilitation of hippocampal synaptic transmission is dependent on tonic A1 receptor inhibition. *Neuroscience*. 2002;112(2):319-29.
- 44 Berliocchi L, Bano D, Nicotera P.  $Ca^{2+}$  signals and death programmes in neurons. *Philos Trans R Soc Lond B Biol* 2005; 360: 2255–2258.

**Tabela 1.** Efeito do antagonismo de receptores  $A_{2A}$  de adenosina na neuroproteção do pré-condicionamento com NMDA contra convulsões induzidas por AQ. Ocorrência de convulsões.

<b>Grupo</b>	<b>Animais sem convulsão</b>	<b>Animais com convulsão</b>	<b>Total de animais</b>	<b>Porcentagem de proteção (%)</b>
<b>SAL</b>	13	0	13	-
<b>NMDA</b>	16	0	16	-
<b>AQ</b>	0	15	15	-
<b>NMDA+AQ</b>	8	11	19	42,11*
<b>NMDA+ZM0h+AQ</b>	9	10	19	47,37*
<b>NMDA+ZM1h+AQ</b>	5	15	20	25,00

Os dados da tabela mostram o número de amostra utilizado e a porcentagem de proteção conferida pelos tratamentos. Os animais foram tratados com salina, NMDA (75mg/Kg i.p) ou AQ (4 $\mu$ L; 9,2 mM i.c.v). O grupo NMDAxAQ recebeu, 24 horas após o NMDA, AQ (4 $\mu$ L; 9,2 mM i.c.v). Os grupos NMDA+ZM0h+AQ e NMDA+ZM1h+AQ receberam, além do acima, o antagonista de  $A_{2A}$  ZM241385 (1 $\mu$ L; 100nM i.c.v.) imediatamente após ou uma hora depois do NMDA, respectivamente. Após os tratamentos, os animais foram observados por 10 minutos, para verificar a incidência de convulsões. Estes dados foram estatisticamente comparados pelo teste exato de Fisher e considerados significativos quando \*P < 0,05, comparado ao AQ.



**Tabela 2.** Efeito do antagonismo de receptores  $A_{2A}$  de adenosina na neuroproteção do pré-condicionamento com NMDA contra convulsões induzidas por AQ. Latência e duração das convulsões.

GRUPOS	Latência das convulsões (s)	Duração das convulsões (s)
AQ	14,33±13,29	97,11±63,14
NMDA		
+AQ	23,26±24,68	52,71±35,12
N+ZM0h+AQ	30,40±29,97	113,14±89,75
N+ZM1h+AQ	16,80±8,57	59,69±38,81

A tabela mostra a latência para a primeira convulsão e a duração desta nos camundongos não protegidos. Os animais foram tratados com NMDA (75mg/Kg i.p) ou AQ (4μL; 9,2 mM i.c.v). O grupo NMDAxAQ recebeu, 24 horas após o NMDA, AQ (4μL; 9,2 mM i.c.v). Os grupos NMDA+ZM0h+AQ e NMDA+ZM1h+AQ receberam, além do acima, o antagonista de  $A_{2A}$  ZM241385 (1μL; 100nM i.c.v.) imediatamente após ou uma hora depois do NMDA, respectivamente. Após os tratamentos, os animais foram observados por 10 minutos, para verificar a incidência de convulsões. Os valores representam média ± desvio padrão (n=15~20 por grupo). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Mann-Whitney).

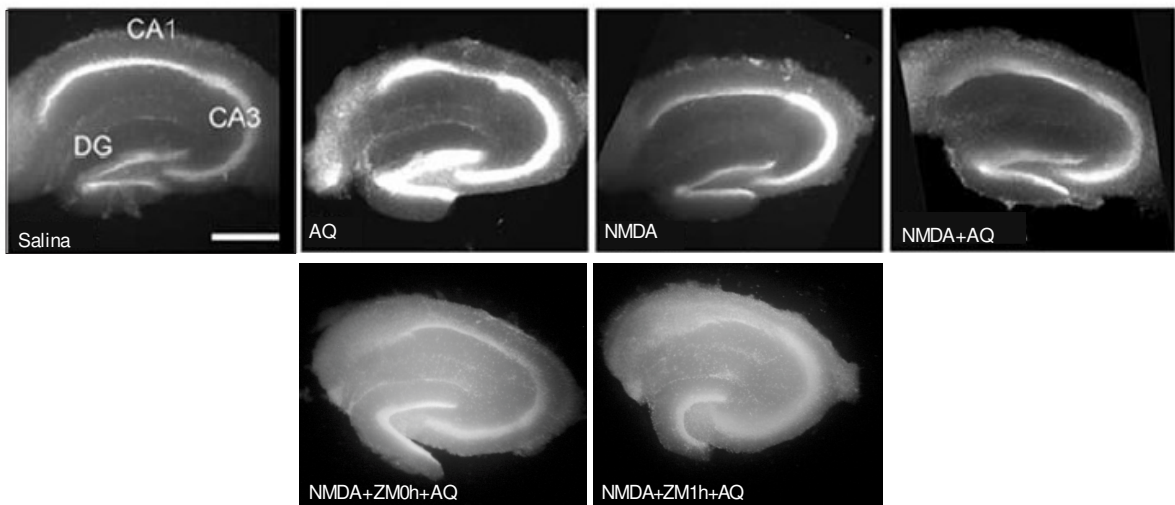
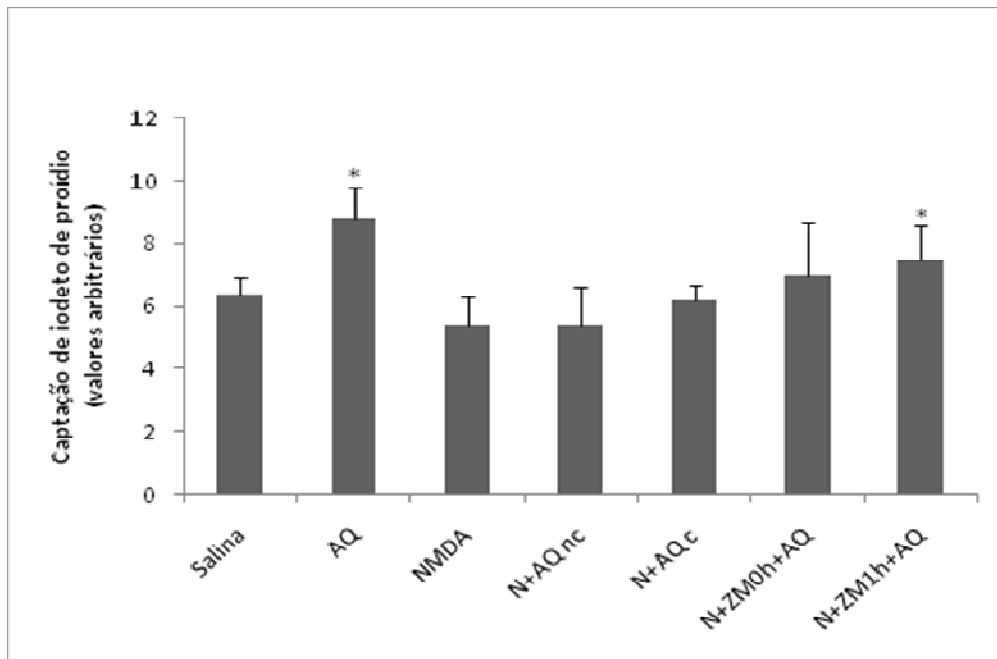
**A****B**

Figura 1 – Quantificação da morte celular em hipocampo nos tratamentos realizados.

Figura 1A – Imagens representativas dos respectivos grupos. As imagens foram obtidas e depois quantificadas pelo software Scion Image (ScionCorp)

Figura 1B - Microfotografias mostram a captação de IP após os tratamentos. A fluorescência corresponde à morte celular em fatias hipocâmpais nos diferentes grupos. Valores apresentados como média (n = 6 por grupo) ± Desvio padrão. \* P < 0,05 (ANOVA 1 via)

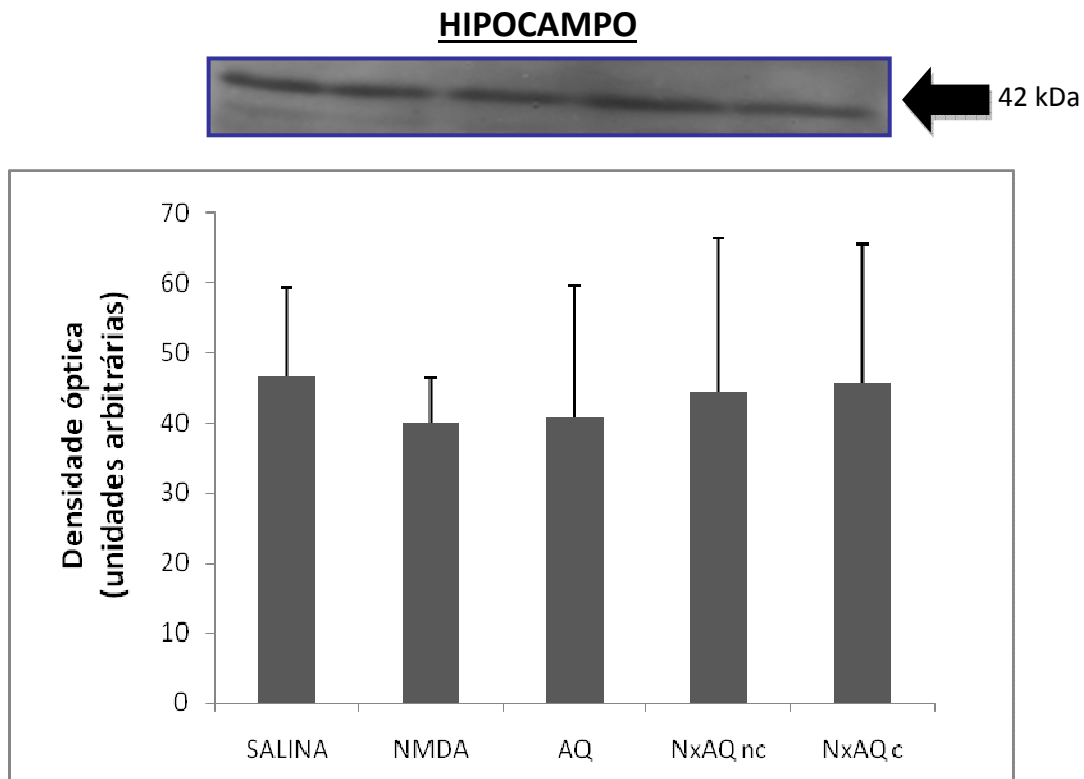


Figura 2 - Representa a quantificação do receptor A<sub>2A</sub> de adenosina nos grupos demonstrados. Os animais foram tratados com salina (grupo controle), NMDA (75mg/Kg i.p) ou AQ (4μL; 9,2 mM i.c.v). Os grupos NxAQ nc e NxAQ c receberam, 24 horas após o NMDA, AQ (4μL; 9,2 mM i.c.v). Painel superior: autorradiograma representativo da detecção do receptor A<sub>2A</sub> de adenosina em hipocampo. As amostras de hipocampo foram dissecadas 24 horas após a administração de AQ. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE 12% e a imunodeteção dos complexos foi realizada pela técnica de *Western blot*. Os valores da quantificação referem-se à densidade óptica, quantificados pelo software Scion Image e estatisticamente comparados com ANOVA de uma via. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão (n=3). P < 0,05 foi considerado significativo. Salina = controle; NMDA= N-metil-D-aspartato; AQ = ácido quinolínico; NxAQ nc = tratados com NMDA que não convulsionaram após administração de AQ; ; NxAQ c = tratados com NMDA que convulsionaram após administração de AQ.

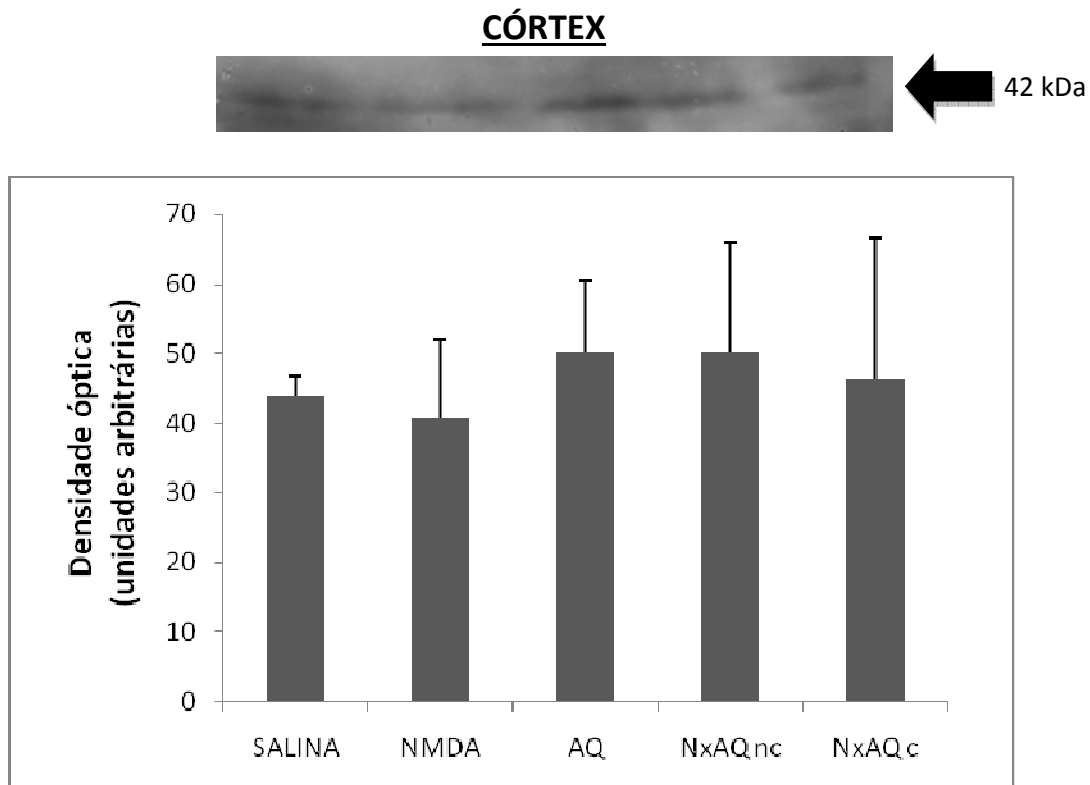


Figura 3 - Representa a quantificação do receptor  $A_{2A}$  de adenosina nos grupos demonstrados. Os animais foram tratados com salina (grupo controle), NMDA (75mg/Kg i.p) ou AQ (4 $\mu$ L; 9,2 mM i.c.v). Os grupos NxAQ nc e NxAQ c receberam, 24 horas após o NMDA, AQ (4 $\mu$ L; 9,2 mM i.c.v). Painel superior: autorradiograma representativo da detecção do receptor  $A_{2A}$  de adenosina em córtex. As amostras de córtex foram dissecadas 24 horas após a administração de AQ. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE 12% e a imunodetecção dos complexos foi realizada pela técnica de *Western blot*. Os valores da quantificação referem-se à densidade óptica, quantificados pelo software Scion Image e estatisticamente comparados ANOVA de uma via. Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=3).  $P < 0,05$  foi considerado significativo. Salina = controle; NMDA= N-metil-D-aspartato; AQ = ácido quinolínico; NxAQ nc = tratados com NMDA que não convulsionaram após administração de AQ; ; NxAQ c = tratados com NMDA que convulsionaram após administração de AQ.